

EXTRACTOS DE PITUITARIA DE TILAPIA Y SU VALORACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO

Ortiz, J^{1,2}; Muñoz, D¹; Giacometti, J¹ & L., Valladares²

⁽¹⁾Laboratorio de Recursos Acuáticos
IASA – ESPE

⁽²⁾Laboratorio de Hormonas y Receptores
INTA – U. Chile

RESUMEN

El control de la reproducción en la piscicultura es un punto crítico dentro del proceso productivo. El uso de pituitarias homólogas de la misma especie y análogos de GnRH es utilizado ampliamente para este propósito. Sin embargo en muchas especies comerciales como la tilapia, el efecto de los mismos no es efectivo. En este estudio se evaluaron concentraciones de pituitaria de tilapia en diferentes modelos animales, generando información importante. Se detectó una acción positiva de pituitaria de tilapia (PT) y pituitaria de carpa (CP) en cultivos *in vitro* de células de Leydig de cobayo, detectándose diferencias en la respuesta a concentraciones de testosterona ($p < 0,05$). En ovarios de trucha y tilapia la respuesta fue positiva en las concentraciones de estradiol, existiendo diferencias entre especies. Cabe recalcar que la acción de PT en ovarios de tilapia es única lo que evidencia la estructura homóloga de la gonodotrofinas y su posible uso en pruebas *in vivo* para el control de la reproducción de la especie en programas selección y mejoramiento.

Palabras Claves: *Oreochromis niloticus*, pituitaria de tilapia, gonodotrofinas, estradiol, testosterona.

ABSTRACT

The control of reproduction in fish farming is critical in the production process. For this purpose, the use of homologous pituitary and GnRH analogues is widely used. However in many commercial species such as tilapia, the treatment is not always effective. In this study, we evaluated different concentrations of tilapia pituitary extracts in different animal models. There was a positive action of pituitary of tilapia (PT) and pituitary of carp (CP) on *in vitro* culture of guinea pig Leydig cells, detecting differences in testosterone levels ($p < 0.05$). In ovaries of trout and tilapia the estradiol levels answer was positive, with differences between species. It should be noted that the action of PT on the Tilapia ovaries is specific because homologous hormones are acting on the gonads, suggesting its possible use *in vivo* experiments for the control of reproduction of the selection and breeding programs of tilapia.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, tilapia pituitary, gonadotrofins, estradiol, testosterone.

1 INTRODUCCIÓN

En el mundo se producen más de 3,09 millones de ton de tilapia, ubicándola por volumen como una de las especies más importantes para la acuicultura. Por su fácil manejo y alta demanda, el cultivo de tilapia se ha generalizado en Latinoamérica, especialmente en Ecuador.

En la última década el crecimiento fue del 56 % con una producción de 37,46 mil ton e ingresos por 123,6 millones de dólares al 2009 (FAO, 2011). Es importante mencionar que esta industria enfrenta grandes retos por la alta competitividad y oferta de países asiáticos, por lo que el manejo de herramientas biotecnológicas será una estrategia competitiva en el mercado.

Bajo estas consideraciones, en Latinoamérica se está implementando varios programas de mejoramiento genético (PMG), con la finalidad de identificar líneas genéticas y mejorar caracteres productivos. Sin embargo, el control de la reproducción en PMG para dirigir cruza individuales se ve afectado en muchas empresas por la ausencia de desoves, fecundidad variable, calidad de los embriones y supervivencia (Gowaty, 1994; Kellogg *et al.*, 1995; Reyes, *com.pers.*).

Las estrategias de regulación endocrina y acción hormonal son utilizadas ampliamente en salmónidos, characidos, cyprinidos entre otros grupos de peces y con resultados importantes en fecundidad y sincronización. Pero en cíclidos como *O. niloticus*, la respuesta a hormonas comerciales, demuestran un limitado número de puestas por ciclo, baja fecundidad y mala fertilización (Pullin *et al.*, 1987; Srisakultiew *et al.*, 1993; Shelton, 1999; Boonet *et al.*, 2007).

En la bibliografía revisada, no se detecta el uso de pituitaria de la misma especie, por lo que la posibilidad de utilizarla en procesos de inducción, sería útil para los propósitos señalados. Cabe recalcar que la estructura secuencial de las hipófisis de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y receptores son las mismas, por ende el efecto sinérgico en todos los procesos esteroideogénicos debe ser evidente. Sin embargo el uso de hipófisis se dirigiría a peces maduros ya que pueden existir efectos diferentes por la presencia de otro tipo de hormonas. Hay que considerar que los procesos de estandarización y evaluación pueden ser altamente variables y en ocasiones provocar patologías (Muñoz Cueto, 2009).

En la actualidad el Ecuador produce más de 30 mil ton de filete fresco de tilapia, con pesos a la cosecha de 800 a 1100 g/pez en un período de 8 a 12 meses y temperaturas de 27°C. Bajo estas características por edad, peso y condición corporal, la disponibilidad de peces maduros e hipófisis es elevada, lo que generaría un valor añadido a un producto residual.

La validación de la actividad biológica en cultivos celulares es utilizada ampliamente en el campo biotecnológico, sin embargo la disponibilidad de bioterios que certifiquen la calidad del modelo biológico (MB) son escasos en países en vías de desarrollo. Los MB ampliamente utilizados para estos propósitos son ratas blancas (línea Western Canadian) de 2, 5 meses de edad en promedio. Bajo esta consideración y apoyados por varios estudios, se empleó MB alternativos, como cobayos peruanos mejorados (*Cavia porcellus* (L)), ovarios de trucha arco iris y tilapia nilótica.

Con estos antecedentes el objetivo de este estudio fue determinar la actividad biológica (AB) de las hipófisis de tilapia en células purificadas de laydig de cobayo y cultivos gonadales de trucha y tilapia, bajo la estrategia dosis –respuesta y la construcción de curvas de saturación.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extractos de hipófisis de tilapia

Los peces fueron obtenidos de la empresa Santa Priscila, ubicada en la provincia del Guayas- Ecuador. Se trabajó con Tilapia del Nilo, línea Chitrala. Las muestras frescas fueron procesadas a 4 °C para la extracción cefálica. Posteriormente en condiciones asépticas, se realizó un corte fino hasta la superficie del cerebro detectándose los lóbulos cefálicos. Por debajo del tercer ventrículo alojada en la silla turca y de una forma libre, con una coloración blanquecina

aperturada se colectó la hipófisis en tubos eppendorf con acetona al 96%. Las pituitarias fueron tratadas acorde a los protocolos de Isaev, 1968.

2.2 Pruebas microbiológicas de los extractos de hipófisis de tilapia

Las pituitarias fueron liofilizadas y preparadas en soluciones con agua miliQ (5, 10, 15 mg/mL). Como control, se utilizó hipófisis de carpa comercial, liofilizada. Los medios de cultivo para crecimiento bacteriano fueron agar nutriente y agar sangre. Para hongos se utilizó agar Sabouraud. Las tinciones se las realizó bajo técnicas convencionales Gram.

2.3 Purificación de células de Laydig de Cobayo peruano mejorado (Cavia porcellus (L))

Previo sacrificio de machos jóvenes con pesos aproximados de 1123 ± 172 gramos, y con edad de 2,5 meses, los testículos extraídos fueron limpiados con agua destilada. Inmediatamente se pusieron en inmersión en una solución basal Eagle (HAM sales balanceadas, sigma ®), a pH 7,4. Posteriormente se agregó 0,25 mg/mL de collagenasa (*Clostridium histoliticum*, sigma ®). Esta solución fue incubada a 37°C en baño maría y agitación constante por 15 minutos. Previa separación del sobrenadante, se centrifugó a 2800 g por 10 minutos y 27 °C. Se eliminó el sobrenadante y a la base sólida se le añadió 5 mL de solución Ham. Todo el proceso se lo realizó a una temperatura de 4 °C y las pruebas de actividad se procesaran en máximo 24 horas (Valladares *et al.*, 1986; 1999). Para comprobación de presencia y carga celular utilizó métodos convencionales y la cámara de Neubauer.

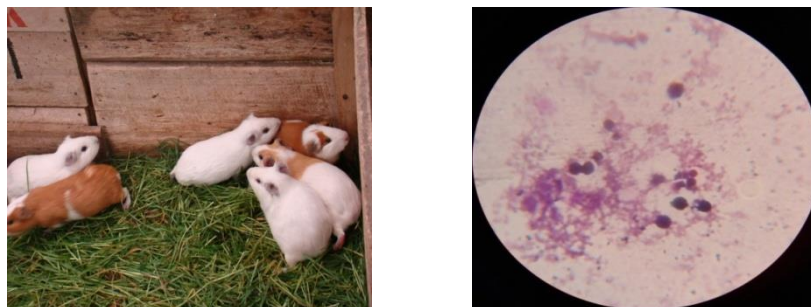


Figura 1. Procesamiento de cobayos peruanos mejorados y purificación de las células de laydig

2.4 Purificación de células de la granulosa de ovarios de Tilapia adulta

Previo sacrificio de hembras jóvenes de *O. niloticus*, los ovarios extraídos fueron limpiados con agua destilada y colocados en proporción de 20 mg/pocillo. Inmediatamente se agregó solución basal eagle (HAM sales balanceadas, sigma ®), a pH 7,4, penicilina, estreptomicina, nystaina y 0,5% BSA sigma ®. Las gónadas fueron lavadas tres veces por intervalos de 1 hora e incubadas a 26°C. En el último lavado se le añadió 0,2 mM de teofilina, sigma ® y por triplicado se dispuso a pruebas de desafío con pituitarias de tilapia y carpa por 18 horas. El sobrenadante fue extraído y conservado a -20°C para posteriores pruebas de EIA para estradiol (Aizen *et al.*, 2007)

2.5 Determinación in vitro la actividad biológica de los extractos de hipófisis de tilapia

Para medir la actividad biológica de los extractos de hipófisis de tilapia se realizó un ensayo de producción de testosterona y 17 β estradiol, bajo la estrategia dosis –respuesta y la construcción de curvas de saturación. Para ello se usaron cultivos primarios de células de granulosa de tilapia y purificadas por método convencional. Alternativamente se usó células laydig de cobayo y se midió la producción de testosterona. (Ko *et al.*, 2007; Kazeto *et al.*, 2008; Valladares *et al.*, 1986,1999).

Para el análisis y cuantificación se usaron técnicas de ELISA (enzima linked inmuno sorbent assay) descritas para 17 β estradiol y testosterona, en el catálogo Accu_Bind Elisa microwells: 3725-300, Monobind inc ®. Se empleo una incubadora Stat-Fax2200 Awarenses Technology inc ®, el espectofotómetro- uQuant-Bio-Tek instruments inc ® y para el lavado de placas el Robot-stat-fax 2600, Awarenses Technology inc ®.

Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA detectó diferencias estadísticas, los tratamientos fueron comparados usando el test Tukey's con un nivel de significancia del 95%. Para este propósito se utilizó el programa Statgraphics ®.

3 RESULTADOS

3.1 Extracción de hipófisis y liofilización

Se procesaron 201 cabezas de tilapia con pesos variables desde 72,07 g hasta los 1184 g/unidad. El mayor porcentaje de individuos fue de 245,38 g/u (n=101) y 529,94 g/u (n=67). La correlación entre peso y longitud se mantuvo en el orden del 98%. En total se recolectaron 326 mg de pituitaria seca de tilapia, con rangos de 0,5 hasta 3,5 mg/pit.

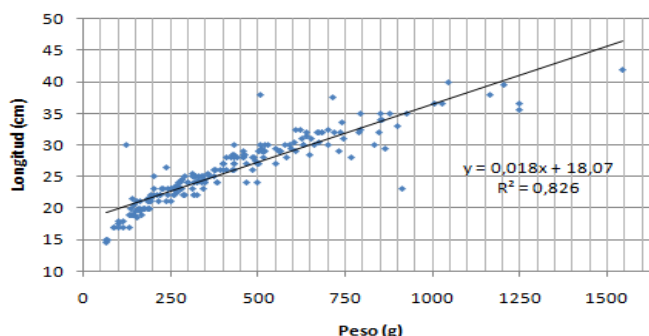


Figura 2. Relación peso longitud de las muestras procesadas

3.2 Microbiología de los extractos de pituitaria de tilapia (PT) y carpa (CP)

En los medios de cultivo de agar nutriente, se detectaron bacilos Gram + (*Bacillus sp.*), las cuales son abundantes en el aire, suelo y agua pero no patógenas. No existió crecimiento de hongos en 24 y 48 horas. No existió crecimiento de bacterias patógenas de características hemolíticas (prueba agar sangre)

3.3 Pruebas de actividad biológica (AB) de PT y CP de laydig de cobayo

Mediante técnicas convencionales de purificación se obtuvo 9×10^4 cel laydig/ μ L. El desafío *in vitro* fue contra 5, 10, 15 mg/mL de PT y CP. El coeficiente de variación (CV) se mantuvo en el orden del 6% entre muestras y ensayos, permitiendo validar los resultados. Las muestras fueron medidas por duplicado detectándose medias y desviaciones estándar.

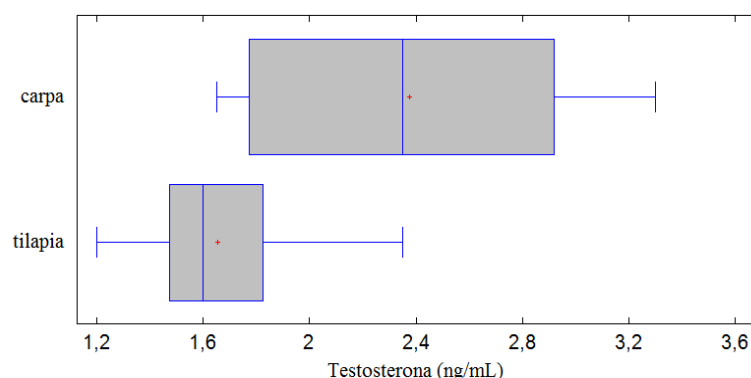


Figura 3. Efecto de PT y CP en Células de Laydig de Cobayo.

El cultivo *in vitro* generó una respuesta positiva de testosterona, frente a la acción de hipófisis de tilapia y carpa con 1,6 y 2,4 ng/mL respectivamente. La acción de pituitaria por especie fue diferente ($p=0,0001$).

La respuesta a una concentración de 5mg pit/ml fue positiva. Los mejores resultados se evidencia con pituitaria de carpa (PC) a una concentración de 15mg/mL, volumen de 20 μ L; 3,3 ng/mL de testosterona (T). Con pituitaria de tilapia (PT) la mejor respuesta se da a una concentración de 5mg pit/ml, volumen de 20 μ L; 2,4 ng/mL de T. Cabe notar que no hay diferencias entre concentraciones ($p=0,2216$), pero si existen diferencias entre volúmenes a diferentes concentraciones ($p=0,0489$).

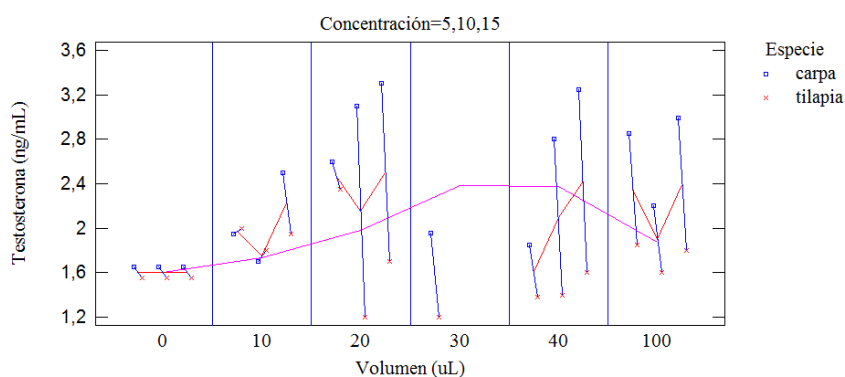


Figura 4. Pruebas de AB de PT y CP contra células de Laydig de cobayo

3.4 Pruebas de AB de PT y CP en ovarios en desarrollo de trucha arco iris

Tomando en consideración que las estructuras de las gonodotrofinas son únicas por especie, en especial de la hormona folículo estimulante, subunidad β , se procedió a realizar pruebas experimentales para estradiol en células de ovarios en desarrollo, de trucha arco iris. La curva estándar creada para estradiol según catálogo Accu_Bind Elisa microwells: 3725-300, Monobind inc®, brindó un nivel de confianza del 99%. El CV entre muestras y ensayos se mantuvo < 6%.

Se trabajaron con truchas de 10 meses de edad con pesos promedio de 800 ± 50 g/unidad un índice gonadosomático (GSI) de 1,875%.

La respuesta a una concentración de 10 mg/mL, en todos los casos fue positiva. Los resultados fueron significativos entre CP y PT ($p=0,0001$) con 2900 y 1500 pg/mL, respectivamente. A una misma concentración y en diferentes volúmenes la respuestas no fue significativa ($p=0,648$).

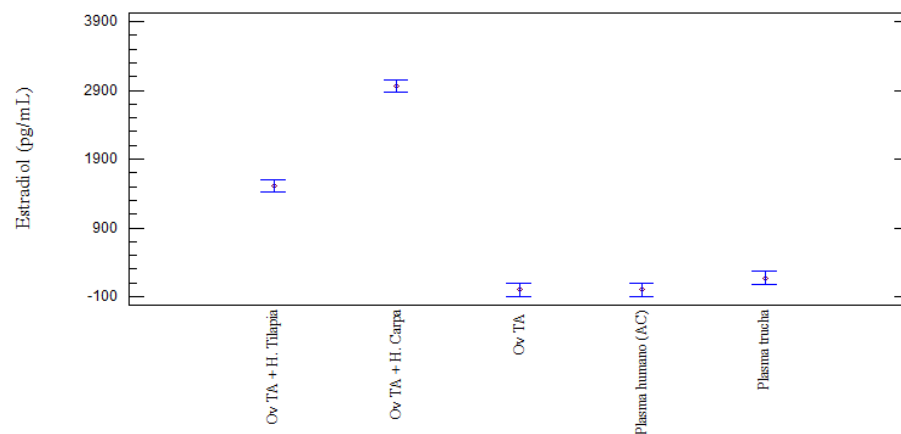


Figura 5. Pruebas de AB de PT y CP contra células de granulosa de trucha arco iris. Ov: Ovarios; TA: Trucha arco iris; H: hipófisis; AC: pastillas anticonceptivas.

3.5 Pruebas de AB de PT y CP en ovarios en desarrollo de tilapia nilótica

Se trabajaron con tilapias de 2,5 meses de edad y peso de 76 g/unidad, IGS de 3,14%. En todos los casos se encontraron diferencias entre grupos ($p=0,0014$). Sin embargo no hay diferencias estadísticas entre concentración y volumen ($p=0,516$ y $p=0,112$).

A una concentración de 5mg/mL tilapia y volumen de 10 μ L la repuesta fue de 2725 pg E_2 /mL. Las pruebas experimentales fueron desafiadas con tres controles: Plasma de tilapia hembra, macho y estradiol presente en los ovarios sin ningún estímulo.

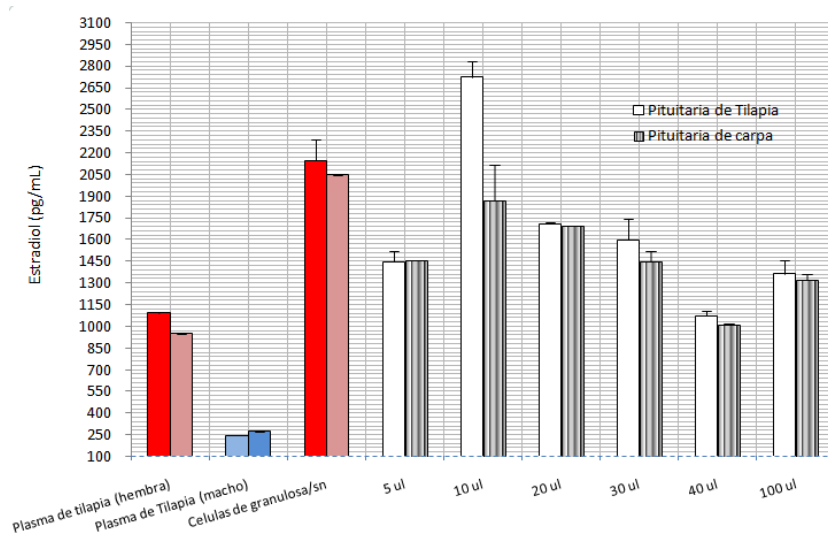


Figura 6. Pruebas de AB de PT y CP (5 mg/mL), contra ovarios en desarrollo en *O. niloticus*.

Las pruebas de desafío con ovarios de tilapia, a una concentración de 10 mg PT/mL generaron una respuesta positiva en todos los casos. A un volumen de 10 μ L la repuesta fue de 2875 pg E_2 /mL. Cabe notar que la respuesta al estímulo de CP, la respuesta no va más allá de los 1900 pg E_2 /mL.

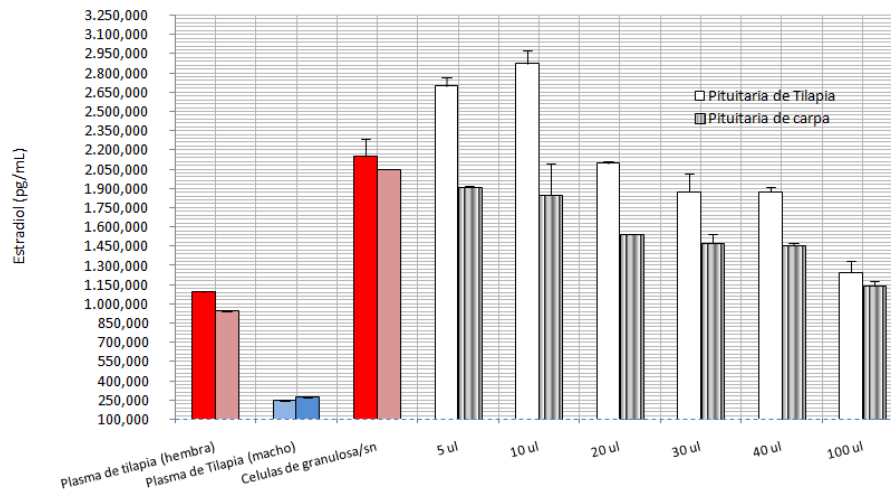


Figura 7. Pruebas de AB de PT y CP (10 mg/mL), contra ovarios en desarrollo en *O. niloticus*.

A una concentración de 15 mg/mL, la mejor respuesta está a un volumen de 5 μ L y una producción de E_2 de 3000 pg/mL.

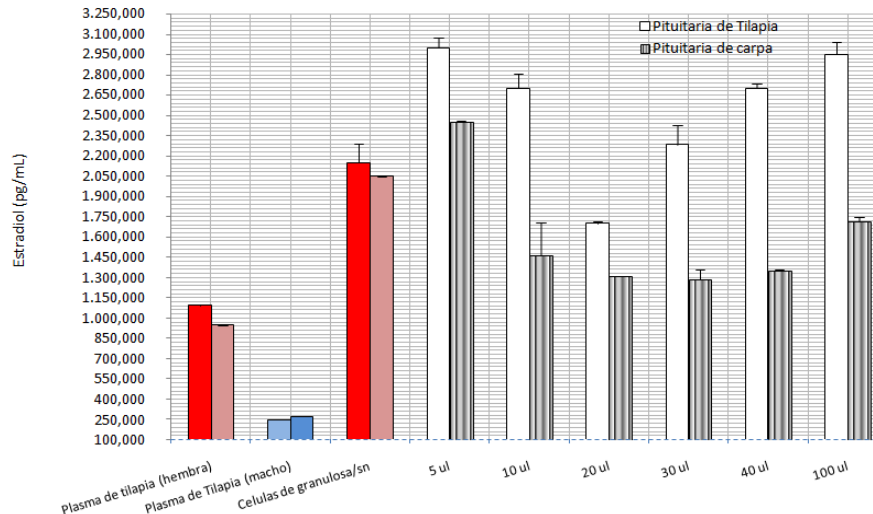


Figura 8. Pruebas de AB de PT y CP (10 mg/mL), contra ovarios en desarrollo en *O. niloticus*.

4 DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la actividad biológica de pituitaria de tilapia (PT) tiene un efecto en tejido y células gonadales. La producción de testosterona (T) en células de Leydig, y estradiol (E₂) en ovarios de trucha y tilapia, es evidente.

Los estímulos generados a diferentes concentraciones de PT, desencadena el acoplamiento de las gonodotrofinas con sus receptores específicos, y por consiguiente los procesos esteroidogénicos. Sin embargo por activaciones cruzadas de las subunidades de FSH y LH y especificidad de receptores hormonales, las respuestas en muchos casos son negativas (Muñoz-Cueto, 2009). En cobayo y trucha existe respuesta a PT pero es baja en comparación a la pituitaria de carpa (CP). Sin embargo la respuesta con PT, en la misma especie, es positiva y va de 2500 hasta 3000 pg E₂/mL, lo que confirma una homología con sus receptores del 100%. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los rangos basales de E₂ en plasma y gónadas obtenidos en este estudio son similares a los trabajos de Cornish, 1998.

Estudios relacionados al uso de hormonas para el control de la reproducción en tilapia son pocos. Ortiz *et al.*, (2000), mediante cromatografía de Sedaphex 100, determina la presencia de una gonodotrofina de 32 KDa en la hipófisis de tilapia y homóloga a FSH de mamíferos. La respuesta de esta gonodotrofina *in vitro*, en células de carpa común (*Cyprinus carpio*), es positiva a concentraciones de 10 µg hasta 50 µg /g de peso vivo. Aizen *et al.*, (2007), demuestra que el uso de gonodotrofinas recombinantes de tilapia, genera respuestas *in vitro* de 11 KT y E₂. El tiempo de respuesta es de 6 horas post inyección para hembras y machos y los valores tienden a normalizarse después de 24 – 26 horas. En todos los casos, los autores mencionan que las secuencias aminoacídicas de tilapia son únicas para la especie.

El uso de PC en tilapia no brinda resultados positivos. Los rangos obtenidos en este estudio determinan una respuesta de 1600 hasta 1750 ng E₂/mL. Rana *et al.*, (1988), determina que la inducción hormonal no es bien aceptada por cíclidos en general y la tasa de fecundidad y eclosión es deficiente. Pullin *et al.*, (1987) en varios estudios demuestra, que el uso de CP y de HCG no son efectivas para la inducción, es así que a concentraciones de 50 UI de HCG obtuvo hasta 3 desoves en 6 meses, sin embargo por puestas naturales, el desove fue superior, tanto por fecundidad y porcentaje de alevinos a nado libre. Shelton, (1999) usa LH análoga comercial (10

mg/kg) y HCG (3500 UI/kg) en una sola dosis en tilapia. La tasa de supervivencia llega al 9% y con una clara reabsorción intra - ovárica y ovas atrésicas.

La acción de FSH y LH de pituitaria de carpa (PC) es positiva en células de laydig de cobayo y ovarios de trucha arco iris con una producción de 2,2 a 3,3 ng T/mL y de 2800 a 3000 pg E₂/mL respectivamente. Estudios relacionados al control de la reproducción en cobayos determinan rangos basales de testosterona de 0,95 a 1 ng/mL. Bajo la acción de HCG, a una concentración de 2,5 UI/mL obtienen rangos de 4 -6 ngT/mL. (Chauca *et al.*, 1994) La respuesta con pituitaria de tilapia y carpa es positiva, generando rangos que varían de 1,5 hasta 3,5 ng T/mL. Cabe recalcar que la homología de secuencias aminoácidas entre Cobayo mejorado y *Cyprinus carpio* está en el orden del 41% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El uso de tecnologías y pruebas in vitro permiten validar la actividad biológica de diferentes principios activos, generando respuestas rápidas y confiables. La dosis efectiva tentativa, para pruebas *in vivo* con PT, sería de 10 mg PT/mL a un volumen de 5 µL.

REFERENCIAS

1. Aizen, J., Kasuto, H., Matan, G., Zakay, H. & B. Levavi. 2007. Tilapia Follicle-Stimulating Hormone (FSH): Immunochemistry, Stimulation by Gonadotropin-Releasing Hormone, and Effect of Biologically Active Recombinant FSH on Steroid Secretion. *Biology of Reproduction* 76, 692–700.
2. Bonnet, E., Fostier, A. & J., Bobe. 2007. Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics*, 8:55.
3. Cornish, Daryl. 1998. Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonads of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Water*
4. Chauca, Lilia. 1994. Sistemas de Producción de cuyes. INIA – Perú. Tomo II. 99 pags.
5. Food and Agriculture Organization (FAO). Fish Stat, 2010. www.fao.org
6. Gowaty, P.A., 1994. Architects of sperm competition. *Trends Ecol. Evol.* 9, 160–162.
7. Isaev, Anatoli. 1968. Metodología del Desarrollo para el tratamiento y procesamiento de hipófisis de peces, para la preparación de hipofisación. Ministerio de pesquería de la URSS, pp 10.
8. Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, Ch., Yamaguchi, S., Trant, J., Adachi, S. & K. Yamauchi. 2008. Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology. *BIOLOGY of Reproduction* 79, 938–946.
9. Kellogg, K.A., Markert, J.A., Stauffer, J.R., Kocher, T.D., 1995. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. *Proc. R. Soc. Lond., Ser.B* 260, 79–84.
10. Ko, H., Park, W., Kim, D., Kobayashi, M. & Y. Sohn. 2007. Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. *Journal of Molecular Endocrinology* 38, 99–111
11. Muñoz – Cueto, J. 2009. La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Capítulo II: regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. Ed. fundación Observatorio español para la Acuicultura, Madrid, 2009. 699 pp

- 12.Ortiz, B, Ramírez, C. & R. Cárdenas. 2000. Obtención de una fracción con actividad gonadotrópica de la hipófisis de la tilapia *Oreochromis niloticus* .Hidrobiología 10(2): 79-84.
- 13.Pullin, E. 1987. Synchronus spawning of Nile tilapia through hypophysation and temperature manipulation. The 2nd international symposium on tilapia in Aquaculture.
- 14.Rana, K. J. 1988. Reproductive biology and the hatchery rearing of tilapia eggs and fry.Pages 343–406 in J.F. Muir and R. J. Roberts, editors. Recent advances in aquaculture, Vol. 3. Crook Helm, London, UK.
- 15.Shelton, W. L. 1999. Nile tilapia gamete management for chromosome manipulation.*In*: K. McElwee, D. Burke, M. Niles, and H. Egna (Editors), Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 10
- 16.Srisakultiew, P. 1993. Studies on the reproductive biology of *Oreochromis niloticus* L.Tesis of Doctor of Philosophy to the University of Stirling. Scotland U.K. pp 267.
- 17.Valladares, L., Erices, A., Lioli, X. & H. Iturriaga. 1999. Characterization of the oligosaccharides of plasma sex hormona binding globulin noncirrhotic alcoholic petients. Steroids 65.275-280.
- 18.Valladares, L., Ronco, A. & A. Pino. 1986. RNA synthesis in the Leydig cellsduring sexual maturation in the rat: Effect of the LH. J. Endocrinology 110: 551-556.
- 19.<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>